



Universidade Federal de São Paulo



Campus Diadema

LORENZO LANG GONZALEZ

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE HEMICELULOSES DE
CANA DE AÇÚCAR EXTRAÍDOS COM DIMETIL
SULFÓXIDO (DMSO) E HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NaOH)

DIADEMA

2020

LORENZO LANG GONZALEZ

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE HEMICELULOSES DE
CANA DE AÇÚCAR EXTRAÍDOS COM DIMETIL
SULFÓXIDO (DMSO) E HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NaOH)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, ao Instituto de
Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade Federal
de São Paulo – Campus Diadema

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Andreia
Cavalari Corete

Diadema

2020

Gonzalez, Lorenzo Lang

Análise da composição de hemiceluloses de cana de açúcar extraídos com dimetil sulfoxido (DMSO) e hidróxido de sódio (NaOH) / Lorenzo Lang Gonzalez. -- Diadema, 2020.

36 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2020.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Andreia Cavalari Corete

1. Hemiceluloses. 2. cana-de-açúcar. 3. Arabinosilano. 4. etanol de segunda geração.. I. Título.

LORENZO LANG GONZALEZ

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE HEMICELULOSES DE CANA DE
AÇÚCAR EXTRAÍDOS COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO) E
HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NAOH)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, ao Instituto de Ciências
Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da
Universidade Federal de São Paulo –
Campus Diadema

Diadema, 13 de outubro de 2020.

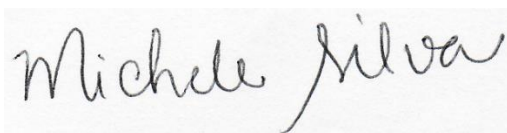
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Aline Andreia Cavalari Corete
Universidade Federal de São Paulo



Dr.^o Marco Aurélio Silva Tiné
Instituto de Botânica de São Paulo



M^a. Michelle Silva

Epígrafe

“Um sistema de desvinculo: Boi sozinho se lambe melhor. O próximo, o outro, não é seu irmão, nem seu amante. O outro é um competidor, um inimigo, um obstáculo a ser vencido ou uma coisa a ser usada. O sistema, que não dá de comer, tampouco dá de amar: condena muitos à fome de pão e muitos mais à fome de abraços.”

(Eduardo Galeano)

Dedico esse trabalho à minha mãe, Eliana, por todo esforço e apoio para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Prof^ª. Dr^ª. Aline Cavalari por todo apoio que me deu nesses longos e árduos anos de graduação, além de passar todo o amor e imensurável conhecimento que você tem de forma tão humilde. Todo apoio, confiança e conversas que tivemos foram cruciais para que eu acreditasse em mim.

Ao Marco Tiné por toda paciência, explicações, conhecimento e por possibilitar fazer parte de um dos projetos mais entusiasmantes e lindos que eu tive o prazer de participar.

Agradeço imensamente a todas as pessoas do setor de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

Ao meu fiel escudeiro, Kevin Fontana, que segurou a barra da graduação comigo e me levantou quando precisava, um companheiro que a UNIFESP me deu e eu levaria por muito tempo.

RESUMO

As aplicações biotecnológicas do bagaço de cana como a geração de etanol, por exemplo, estão diretamente ligadas à compreensão da estrutura da parede celular da cana. Apesar da importância da planta para toda a cadeia produtiva, diversos aspectos da estrutura da parede celular da cana ainda não foram esclarecidos, em especial o padrão de ramificação com acetato e ácido ferúlico na principal hemicelulose da parede de cana: o arabinoxilano. Em grande parte, o problema se deve ao protocolo típico de extração de polissacarídeos que fraciona a parede com NaOH que devido ao elevado pH altera a estrutura nativa do polissacarídeo. Para estudar a estrutura nativa das hemiceluloses é preciso desenvolver protocolos de extração que evitem pH's extremos, sendo esse o objetivo deste projeto propor o desenvolvimento de uma técnica de extração de hemicelulose baseada em dimetil sulfóxido (DMSO) mantendo ao máximo a estrutura nativa dos polímeros. A partir do material extraído por técnicas tradicionais (fracionamento com NaOH) e extração com DMSO serão feitas análises quantitativas (rendimento), qualitativas por meio da análise de monossacarídeos, além de uma avaliação de qual a melhor técnica de extração para análise de arabinoxilano de cana de açúcar. Foi observado que a purificação com resina Amberlite XAD-2 foi bastante eficiente para a separação dos oligossacarídeos, na análise por HPLC foi possível observar a presença de compostos fenólicos no material extraído, sugerindo uma presença de ácido ferúlico no material extraído com DMSO.

Palavras-chaves: Hemiceluloses; Arabinoxilano; cana-de-açúcar, etanol de segunda geração.

Abstract

The biotechnological applications of sugarcane bagasse such as ethanol generation are directly linked to the understanding of the structure of the sugarcane cell wall. Despite the importance of this plant for the entire production chain, several aspects of the structure of the sugarcane cell wall have not yet been clarified, especially the branching pattern with acetate and ferulic acid in the main hemicellulose of the cane wall: arabinoxylan. The problem is largely due to the typical polysaccharide extraction protocol that fractionates the wall with NaOH, and due to the high pH, it alters the polysaccharide's native structure. Therefore, to study the native structure of hemicelluloses, it is necessary to develop extraction protocols that avoid extreme pH's. Thus, the objective of this project is to propose the development of a hemicellulose extraction technique based on dimethyl sulfoxide (DMSO) while maintaining the native structure of the polymers to the maximum. From the material extracted by traditional techniques (fractionation with NaOH) and extraction with DMSO, quantitative analyzes based on yield will be made, qualitative through the analysis of monosaccharides, in addition to an evaluation of which is the best extraction technique for analysis of arabinoxylan of sugar cane. It was observed that purification with Amberlite XAD-2 resin was quite efficient for the separation of oligosaccharides, in the HPLC analysis we observed the presence of phenolic compounds in the extracted material, suggesting a presence of ferulic acid in the material extracted with DMSO.

Keywords: Hemicelluloses; Arabinoxylan; sugar cane, second generation ethanol.

Lista de figuras e gráficos

Figura 1- Desenho esquemático da estrutura da parede celular e o arranjo dos principais constituintes: lignina, hemiceluloses, celulosas e fibras elementares.

Figura 2- Estrutura parcial do arabinoxilano.

Figura 3- Principais ramificações dos arabinoxilanos de paredes celulares de gramíneas. As cadeias de xilano são representadas pelas linhas pontilhadas e os resíduos de arabinose (Ara) podem apresentar: grupos acetila (1), éster de ácido ferúlico ligado ao arabinoxilano (2), arabinose ligada diretamente a lignina (3) ou diferulatos formando ligações cruzadas entre polissacarídeos (4) e ésteres de ácido ferúlico ligados à lignina (5).

Figura 4- A figura A ilustra a plantação cana de açúcar realizada no núcleo de fisiologia e bioquímica do Instituto de botânica; Figura B estão os colmos cortados e lavados e em seguida, na figura C temos o pó do colmo de cana.

Figura 5- fluxograma do trabalho a ser realizado, mostrando as relações entre as diferentes etapas do processo de otimização do protocolo de extração

Figura 6-Espectro de FT-IR com sua área normalizada. Regiões típicas de vibrações de fenóis estão indicadas por barras azuis. AG= pó de cana extraído com DMSO em agitação; US= pó de cana extraído com DMSO em ultrassom; 0,1M= extração com NaOH 0,1M e; 4M = extração com NaOH 4 M.

Figura 7- Gráfico comparativo das frações de colmo de cana SP purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC

Figura 8- Gráfico comparativo das frações de colmo cana-de-açúcar da variedade RB, purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC.

Figura 9- Gráfico comparativo das frações de folha de cana-de-açúcar da variedade RB purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC.

Figura 10- Gráfico comparativo das frações de folha de cana-de-açúcar da variedade SP purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC.

Gráfico 1: Rendimento em porcentagem das extrações de pó de bagaço de cana em diferentes condições. 90% DMSO orbital = agitação orbital constante overnight com DMSO 90%, Agitação= extração com agitação com barra magnética constante overnight com DMSO, Orbital= agitação orbital constante overnight com DMSO 100%.

Gráfico 2- Rendimento em porcentagem da segunda extração feita utilizando colmo de cana-de-açúcar de duas variedades (RB e SP) disponíveis com DMSO em agitação orbital.

Gráfico 3- Rendimento de todas as extrações individuais e a média.

Gráfico 4- Comparação de rendimento de duas extrações a partir da mesma variedade, porém feitas em anos diferentes.

Lista de abreviaturas e siglas

1G- Etanol de primeira geração

2G- Etanol de segunda geração

AIR – do inglês *alcohol-insoluble residue*

DMSO- Dimetilsulfóxido

EUA – Estados Unidos da América

FT-IR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Ha – Hectares

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

NaOH- Hidróxido de Sódio

ONU – Organização das Nações Unidas

ODS - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL.	13
1.2.	CARACTERÍSTICAS DA PAREDE CELULAR DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	15
1.3.	ARABINOXILANO	16
1.4.	PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	18
2.	JUSTIFICATIVA	19
3.	OBJETIVOS	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1.	OBTENÇÃO DO RESÍDUO INSOLÚVEL EM ÁGUA.....	20
4.2.	EXTRAÇÃO COM DMSO	21
4.3.	PREPARO DE OLIGOSSACARÍDEOS DE ARABINOXILANO	22
4.4.	PREPARO DE POLISSACARÍDEO PARA ANÁLISE COM ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	22
4.5.	PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEO COM RESINA AMBERLITE XAD-2 E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1.	EXTRAÇÕES E RENDIMENTOS DE DMSO	24
5.2.	ANÁLISE DE POLISSACARÍDEO E OLIGOSSACARÍDEO COM ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR)	27
5.3.	PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEO COM RESINA AMBERLITE XAD-2 E ANÁLISE POR HPLC	29
6.	CONCLUSÃO	31
7.	REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância econômica do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil.

Nos últimos 200 anos iniciou-se uma intensa exploração de recursos energéticos não renováveis, como petróleo, gás natural e carvão, porém esses recursos além de finitos, causa grandes problemas para o meio ambiente como a degradação da camada de ozônio causada pelas emissões exacerbadas de gases e o aquecimento global (FERRARI, 2010; VIEIRA *et al.*, 2020). No entanto atualmente diversos países e organizações importantes como a Organização das Nações Unidas (ONU) procuram fontes alternativas, acessíveis e renováveis de energia para suprir a demanda mundial, sendo esse um dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) proposto pela ONU (UNIDAS, 2015).

A energia gerada a partir de plantas, ou agroenergia, tornou-se uma importante ferramenta para alcançar esse objetivo por terem menor custo e uma fonte sustentável de biomateriais para produção não só de biocombustível, mas também de geração de energia, sendo atualmente a cana-de-açúcar e o milho as fontes mais utilizadas para esse fim (KLEIN *et al.*, 2019; SANCHEZ *et al.*, 2019).

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, gênero *Saccharum*, e atualmente é dividida em seis espécies: *S. spontaneum* L., *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinensis* e *S. edule* (AMARAL; SANTOS; BARBOSA, 2015). No entanto atualmente as variedades utilizadas no plantio são variedades provenientes de híbridos inespecíficos entre *Saccharum spontaneum* e *S. officinarum*, características marcantes das duas espécies são a alta presença de sacarose (*S. officinarum*) e a adaptação para crescer em diversas altitudes em climas tropicais e subtropicais (*S. spontaneum*) (FERRARI, 2010).

As primeiras mudas de cana-de-açúcar foram trazidas ao Brasil na época colonial durante a segunda expedição de Cristóvão Colombo, por Martim Afonso de Souza, pois elas eram plantas em novas terras para servir de suprimento durante as expedições (CESNIK, 2012).

O Brasil é o país mundialmente conhecido por sua alta capacidade de produção de vários tipos como grãos, frutas, café e cana-de-açúcar (KLEIN *et al.*, 2019). No decorrer dos anos a cana-de-açúcar passou a ser uma das maiores e mais importantes plantações mundiais, sendo o Brasil um dos principais responsáveis por essa produção com cerca de 8,4 milhões de hectares (ha) colhidos na safra 2019/2020 com produtividade média de 76,113 kg/há, totalizando 642,7 milhões de toneladas colhidas no país, enquanto no ano de 2005 foram colhidos aproximadamente 425 milhões de toneladas (AMARAL; SANTOS; BARBOSA, 2015; CONAB, 2020).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, com produção de 34 bilhões de litros produzidos na safra 2019/2020 representando cerca de 30% da produção mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos da América (EUA) que produz biocombustível a partir do milho (*Zea mays*) (54%) (CONAB, 2020; KOEHLER *et al.*, 2020). No entanto a produção a partir do milho tem um menor rendimento na produção a partir do etanol quando comparada a cana-de-açúcar, rendendo cerca de 4.000 litros de etanol por hectare, enquanto a cana tem um rendimento médio de aproximadamente 7,5 litros por hectare ou 80 litros por tonelada (FERRARI, 2010).

Toda essa capacidade produtiva somada aos inúmeros avanços de técnicas de melhoramento genético das últimas décadas auxiliou o desenvolvimento de variedades de cana que fossem mais resistentes a estresses bióticos ou abióticos, e até mesmo que tenha um maior rendimento de açúcar (CESNIK, 2012).

A partir do processamento e fermentação do açúcar presente na cana pode-se obter o etanol de 1ª geração (1G), porém gera milhares de toneladas de bagaço que podem ser convertido em açúcares fermentáveis para produção de mais etanol, conhecido como etanol de 2ª geração (2G), mas atualmente são convertidos em calor e energia elétrica (DE CARVALHO; ANTUNES; FREIRE, 2016; FERRARI, 2010; KHATTAB; WATANABE, 2019a).

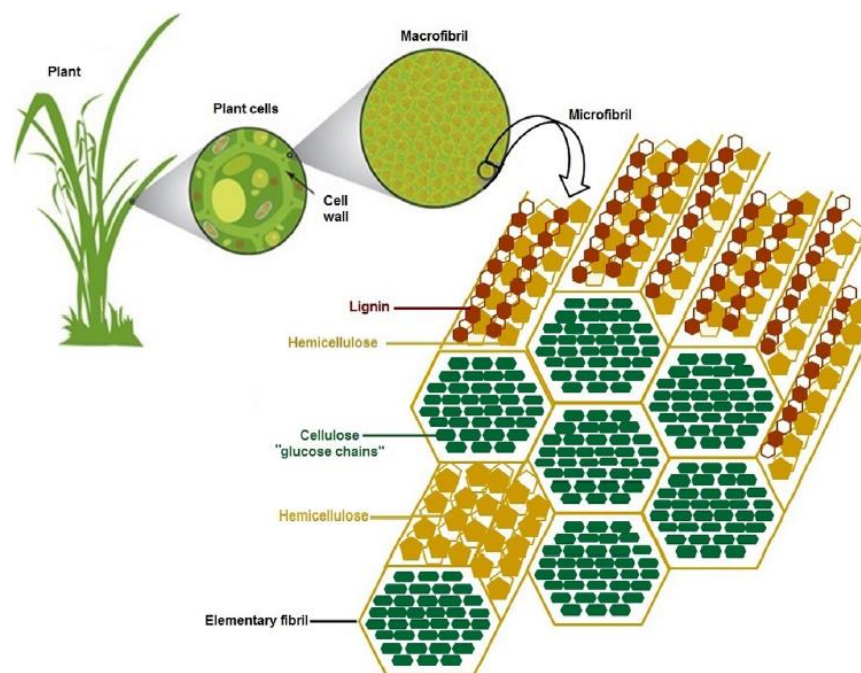
Apesar de já existir tecnologia para produção do etanol a partir do material lignocelulósico o alto custo desse processo o torna economicamente inviável,

necessitando de investimentos em pesquisa para a redução do custo (BARBOSA *et al.*, 2020; FERRARI, 2010; OTERO; PANAGIOTOU; OLSSON, 2007).

1.2. Características da parede celular da cana-de-açúcar

As características que fazem da cana de açúcar uma ótima opção para geração do etanol 2G é a quantidade de biomassa que é descartada somada à heterogeneidade de sua parede celular, composta por 20 a 30% de lignina, 40 a 45% de celulose e 30 a 35% de hemicelulose (Figura 1) (KHATTAB; WATANABE, 2019a).

Figura 1- Desenho esquemático da estrutura da parede celular e o arranjo dos principais constituintes: lignina, hemiceluloses, celuloses e fibras elementares.



Fonte: (KHATTAB; WATANABE, 2019b)

Para que o etanol de segunda geração seja preparado é necessário solubilizar o carboidrato presente na fração lignocelulósica para em seguida fermentá-la, no entanto para esse processo ocorrer é necessário que ocorram pré-tratamentos, assim as porções de hemicelulose e lignina sejam removidas deixando a celulose mais acessível às enzimas (KHATTAB; WATANABE, 2019a; VIEIRA *et al.*, 2020)

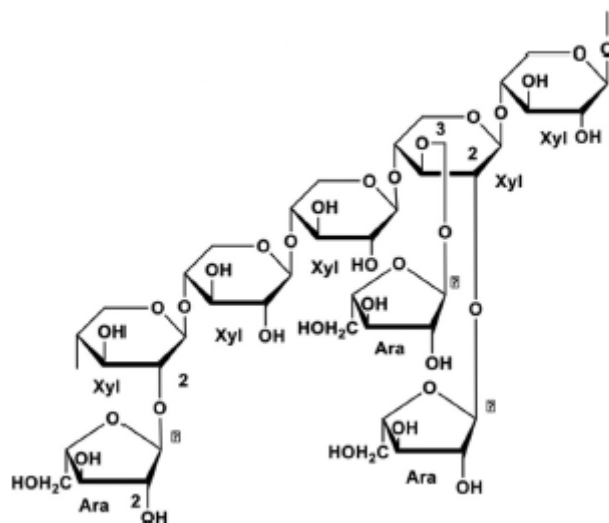
A hemiceluloses é um heteropolissacarídeo com ligações β -(1 \rightarrow 4) composta por unidades de d-xilose, seguidos de d-glicose e l-arabinose com unidades menores de manose e galactose e a sua classificação é dada de acordo com ao açúcar presente na cadeia principal, sendo o glucano, xiloglucano e arabinoxilano as hemiceluloses mais comuns no bagaço de cana-de-açúcar (BEZERRA; ART J., 2019; CARPITA; GIBEAUT, 1993; FERRARI, 2010).

O glucano de ligação mista apresenta uma cadeia de glicose ligada β -(1 \rightarrow 4) interrompida por ligações β -(1 \rightarrow 3) entre as glicoses. Estas interrupções na cadeia β -(1 \rightarrow 4) diferenciam o glucano da celulose e tornam a cadeia não linear, impedindo a formação de feixes insolúveis como a celulose. Outras hemiceluloses como o xiloglucano também podem estar presentes em menor quantidade na estrutura da parede celular (KHATTAB; WATANABE, 2019a).

1.3. Arabinoxilano

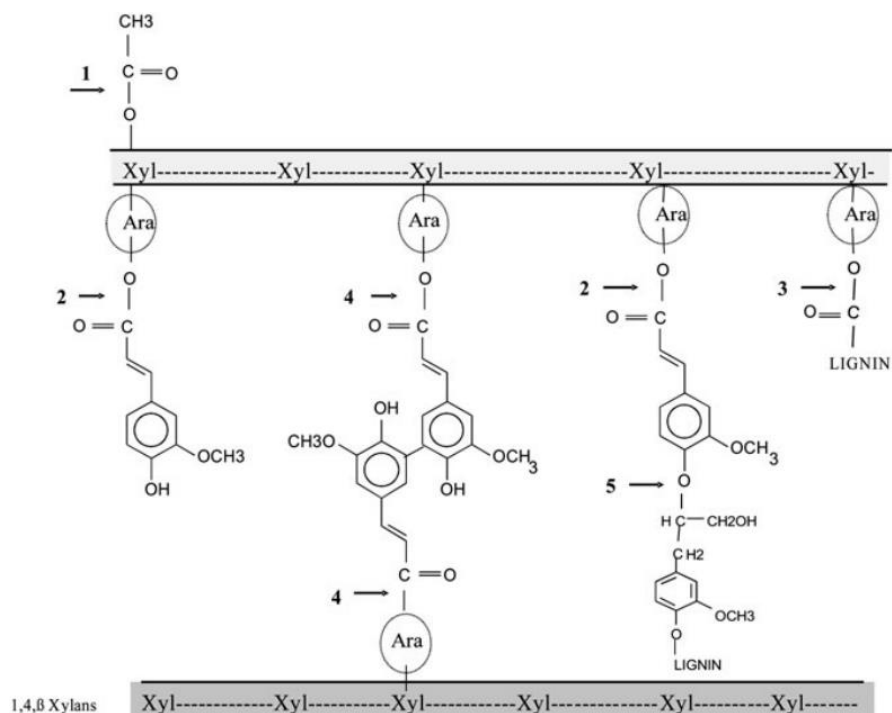
O arabinoxilano é uma das principais hemiceluloses das gramíneas e, quantitativamente, a mais importante na cana de açúcar. Essa hemicelulose possui uma cadeia principal de xilose ligada β (1 \rightarrow 4) e tal estrutura deixa livre para as ramificações apenas as hidroxilas ligadas aos carbonos 2 e 3 (Figura 2) (KHATTAB; WATANABE, 2019a). Nessas duas posições livres podem se ligar ramificações de arabinose ligados à cadeia principal por ligações α (1 \rightarrow 2) ou α (1 \rightarrow 3), resíduos de ácido glucurônico α (1 \rightarrow 2), acetilações ou ainda ligações com ácido ferúlico (CRIVELLARI, 2012) (Figura 3).

Figura 2- Estrutura parcial do arabinoxilano



Fonte: (KHATTAB; WATANABE, 2019b)

Figura 3- Principais ramificações dos arabinoxilanos de paredes celulares de gramíneas. As cadeias de xilano são representadas pelas linhas pontilhadas e os resíduos de arabinose (Ara) podem apresentar: grupos acetila (1), éster de ácido ferúlico ligado ao arabinoxilano (2), arabinose ligada diretamente a lignina (3) ou diferulatos formando ligações cruzadas entre polissacarídeos (4) e ésteres de ácido ferúlico ligados à lignina (5). (CRIVELLARI, 2012)



Fonte: (BUANAFINA, 2009)

Toda essa riqueza de possibilidades torna possível a variação de sua estrutura química em função do tecido, da célula e até da região da parede (CRIVELLARI, 2012).

As diferentes características da molécula como grau de ramificação, arranjo dos resíduos de arabinose e ligação com ácido ferúlico e acetilações podem influenciar as propriedades físico-químicas da molécula como viscoelasticidade e resistência (BUANAFINA, 2009). Em cevada, por exemplo, paredes de vasos condutores possuem arabinoxilanos menos ramificados, enquanto os que constituem as paredes celulares de grãos e tecidos jovens apresentam podem apresentar um alto grau de ramificação (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

1.4. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Na produção do etanol celulósico é necessário que haja um pré-tratamento da biomassa para ocorrer a deslignificação para recuperar a celulose que será posteriormente convertida em açúcares fermentáveis (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

Uma das alternativas de pré-tratamento utilizadas comercialmente é a realizada por meio de hidrólise alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) (CANDIDO; MORI; GONÇALVES, 2019). Essa etapa é rotineiramente associada à deslignificação da biomassa e embora os altos pHs promovam outras alterações na biomassa tais como hidrólises de radicais acetil e rompimento da estrutura nativa da parede, alterando as ligações entra a celulose e outros polímeros esse método acaba tornando-se menos interessante, pois reduz para menos de 26% o conteúdo de lignina (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; KHATTAB; WATANABE, 2019a).

Acredita-se que o acetato seja liberado pela hidrólise das acetilações presentes na estrutura das hemiceluloses (ALVIRA *et al.*, 2010; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000), embora a estrutura e o padrão de ramificações ainda não tenham sido definidos.

Do ponto de vista tecnológico, esse acetato livre dificulta a digestão do polissacarídeo pelas hidrolases e é tóxico para os microrganismos, o que dificulta fermentação (PALM; ZACCHI, 2003). Sua eliminação é importante para as etapas posteriores do processamento da biomassa. A desacetilação da biomassa aumenta a liberação das pentoses (remoção das hemiceluloses) durante o pré-tratamento assim como a digestibilidade dos polissacarídeos para as enzimas durante a degradação enzimática do polímero e reduz a liberação de compostos tóxicos para os microrganismos na etapa de fermentação (CHEN *et al.*, 2012).

O bagaço de cana contém cerca de 20% de sua massa seca na forma de xilose e libera cerca de 3 a 4% de sua massa seca na forma de acetato durante o pré-tratamento (AGUILAR *et al.*, 2002). Se considerarmos que todo o acetil está ligado à cadeia principal do arabinoxilano, a proporção obtida é de duas xiloses para cada acetil, ou seja, metade das xiloses estaria acetilada.

O fato da análise típica dos polissacarídeos de parede celular incluir o fracionamento dos polissacarídeos de parede celular com NaOH seguida por hidrólise ácida dificulta a compreensão do padrão de acetilação, pois o alto pH hidrolisa as acetilações e portanto, o polissacarídeo analisado pode não apresentar o verdadeiro padrão de ramificação existente *in vivo* (DE SOUZA *et al.*, 2013; KHATTAB; WATANABE, 2019a). Técnicas de fracionamento da parede que envolvam pHs extremo não são apropriados para analisar o padrão de acetilação e feruloilação das hemiceluloses e consecutivamente a determinação de sua estrutura nativa.

2. JUSTIFICATIVA

O rendimento do etanol de primeira geração a partir da cana de açúcar é baixo, além disso o material lignocelulósico presente no bagaço é rico em açúcares que podem ser fermentados afim de gerar mais etanol (segunda geração) em uma mesma área de plantio. Portanto esse projeto visa propor um método de extração eficaz para acessar os açúcares presentes na parede celular com um melhor custo benefício em comparação aos métodos utilizados atualmente.

3. OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo definir um protocolo para extração de arabinoxilano a partir do colmo de cana de açúcar com dimetil sulfóxido (DMSO). Para tanto, as etapas foram:

3.1. Comparar o rendimento de polissacarídeos extraídos por diferentes tempos, condições de agitação, concentrações de DMSO e diferentes números de extrações;

3.2. Análise de polissacarídeo e oligossacarídeo por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O método de extração será baseado na extração dos polissacarídeos com DMSO (NARAN *et al.*, 2009). Como comparação com métodos tradicionais também serão feitas extrações sucessivas em condições crescentes de NaOH. Neste ponto, será necessário otimizar diversos parâmetros de extração para tornar ótimo o protocolo de extração.

4.1. Obtenção do resíduo insolúvel em água

Foram plantadas mudas de cana de açúcar das variedades, SP80-3280 e RB835486 (Figura 4.A) e cultivadas por 6 meses no canteiro do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica. Após a coleta, o material foi pesado, medido e cortado com facão (Figura 4.B), em seguida a cana foi seca em liofilizador, moído em moinho de facas (figura 4.C) e o pó foi extraído com etanol 80% a 60° C para a remoção de açúcares. O material resultante foi chamado de resíduo insolúvel em álcool, do inglês AIR.

Figura 4- A figura A ilustra a plantação cana de açúcar realizada no núcleo de fisiologia e bioquímica do Instituto de botânica; Figura B estão os colmos cortados e lavados e em seguida, na figura C temos o pó do colmo de cana.



4.2. Extração com DMSO

Para a extração de parede, dois gramas de pó de cana de açúcar foram extraídos com 36 mL de DMSO. Foram inicialmente testados três métodos de extração: 1- com agitação orbital overnight; 2- extração com 90% de DMSO em agitação orbital; e 3- agitação constante com barra magnética. Foram realizadas três extrações sucessivas, terminada a extração o material foi centrifugado a 15.000 RPM por 15 minutos, o sobrenadante coletado e em seguida dialisado em água destilada e liofilizado.

Uma vez definido que a melhor forma de extração é através de agitação orbital, foi feito um segundo experimento para definir qual o melhor número de extrações necessárias para otimizar a extração do arabinoxilano. Para isso, foram pesados dois gramas de pó de cana de açúcar em três tubos *falcon* e acrescentado 36 mL de DMSO, em agitação orbital por 24 horas. Após a extração, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado e separado.

O sedimento foi submetido a mais duas extrações sucessivas e o sobrenadante dessas extrações foram reservados. Os sobrenadantes foram dialisados e liofilizados como descrito anteriormente e o rendimento do material extraído foi aferido. Para a extração de folhas foi realizado o mesmo método citado acima para o colmo.

4.3. Preparo de oligossacarídeos de arabinoxilano

Foi preparado oligossacarídeo de arabinoxilano a partir do pó extraído com DMSO em agitação orbital (pó orb), para isso utilizamos 5 mg de pó orb, 20 µL de enzima xilanase, 50 µL de tampão trisaminometano-ácido clorídrico (Tris-HCl) 100 mM pH 7,5 e 930 µL de água destilada, encubado a 30° C por 24 horas e centrifugado a 10.000 RPM, em seguida foi coletado o sobrenadante e o precipitado, que foi lavado três vezes com etanol 80% gelado.

4.4. Preparo de polissacarídeo para análise com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Para a análise no FT-IR utilizamos 10 mg de pó extraído em agitação orbital da primeira extração, foram adicionados 100 µL de NaOH 4 mol/L e 300 µL de água destilada, foi encubado a 30° C por uma hora, após encubação neutralizamos com 130 µL de ácido acético 3 mol/L e adicionamos 1,5 mL de etanol absoluto e mantido em freezer overnight. Após esse período foram realizadas três vezes lavagens com etanol 80% gelado, o sobrenadante foi coletado e seco em liofilizador.

Também foram analisados os resíduos gerados a partir do preparo de oligossacarídeos digeridos com xilanase descrito no acima e o pó extraído com DMSO em agitação orbital.

Foram feitas duas análises por FT-IR com diferentes materiais, um deles está descrito acima e o outro material foi adquirido do projeto anterior, esse material consiste em pó de cana-de-açúcar extraído com DMSO em agitação por barra magnética, ultrassom, e extrações com NaOH 0,1 mol/L e 4 mol/L.

4.5. Purificação de oligossacarídeo com resina Amberlite XAD-2 e análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

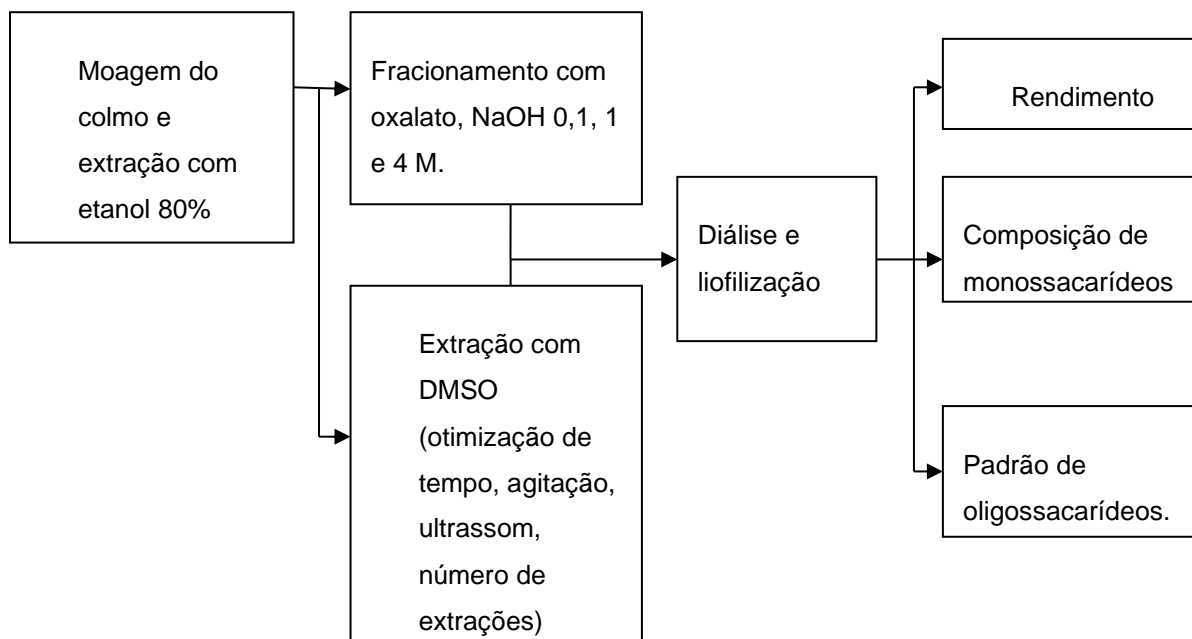
A purificação de oligossacarídeos foi feita com a resina Amberlite XAD-2, foram utilizadas soluções com decrescentes polaridades, sendo elas: A- 10% etanol absoluto; B- 50% de etanol absoluto; C- 90% de etanol absoluto; D- 1 etanol:1butanol; E- 100% butanol absoluto.

A coluna de Amberlite XAD-2 foi lavada com 2 mL de solução A, após terminar a lavagem da coluna com a primeira solução adicionamos 100 µL de oligossacarídeo diluído 50 vezes, em seguida adicionamos 2 mL cada uma das soluções descritas acima, esperando terminar a passagem de uma solução pela coluna para colocar a seguinte.

Cada uma das frações foi coletada em tubo de microcentrífuga de 2 mL. Todas as frações foram secas em *SpeedVac* e ressuspendidas em etanol absoluto.

A análise por HPLC foi feita com detecção de 254 nm, fluxo de 0,8 mL/min, por trinta minutos, 95% aceto nitrila com 5% água variando até 50% água, a injeção foi de 20 µL de amostra por injeção manual.

Figura 5- fluxograma do trabalho a ser realizado, mostrando as relações entre as diferentes etapas do processo de otimização do protocolo de extração



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extrações e rendimentos de DMSO

Quando analisamos o rendimento mostrado na figura 5 podemos ver que as extrações tiveram rendimento médio igual independentemente do tipo de extração, por isso escolhemos agitação orbital com DMSO 100% o mais conveniente, pois esse foi o material que apresentou maior volume pós extração.

Como podemos ver na figura 6 a segunda extração com DMSO feita nesse material teve um maior rendimento em porcentagem do que o material da primeira extração. Utilizamos a mesma forma de extração que foi por agitação orbital com DMSO puro.

Para estimar melhor a porcentagem de material extraído, foram realizadas cinco extrações simultâneas e calculada a média (Gráfico 1). Quando analisamos essa média com as outras extrações vemos que foi semelhante com as extrações realizadas anteriormente. Um menor rendimento na extração com DMSO é

esperado dada a condição branda e pouco caotrópica do método. Com isso, é extraída uma fração de polissacarídeos fracamente ligada à celulose.

Gráfico 1: Rendimento em porcentagem das extrações de pó de bagaço de cana em diferentes condições. 90% DMSO orbital = agitação orbital constante overnight com DMSO 90%, Agitação= extração com agitação com barra magnética constante overnight com DMSO, Orbital= agitação orbital constante overnight com DMSO 100%.

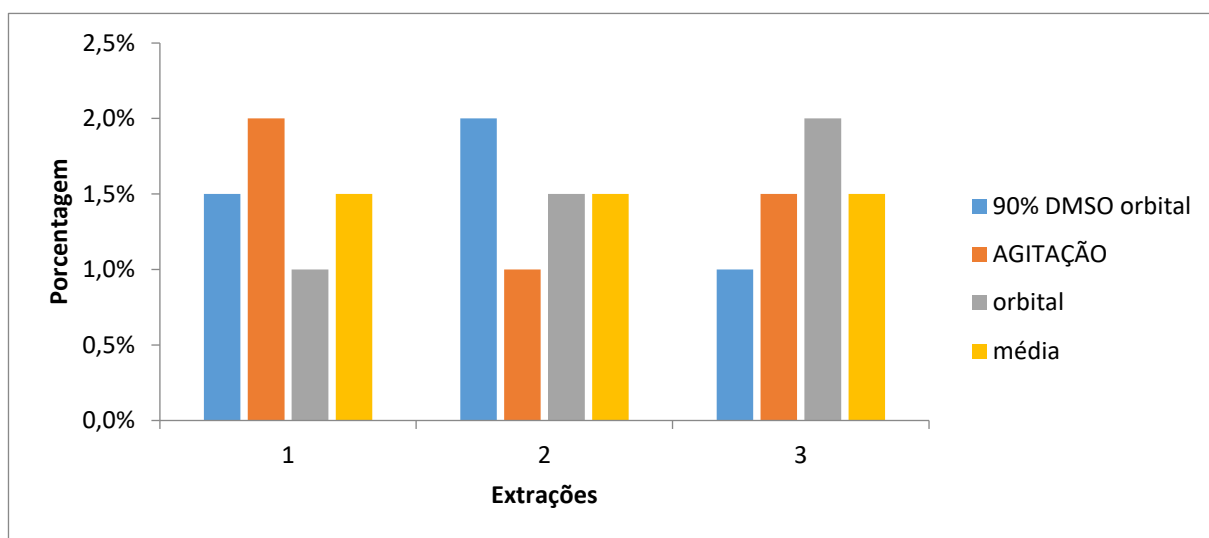


Gráfico 2- Rendimento em porcentagem da segunda extração feita utilizando colmo de cana-de-açúcar de duas variedades (RB e SP) disponíveis com DMSO em agitação orbital.

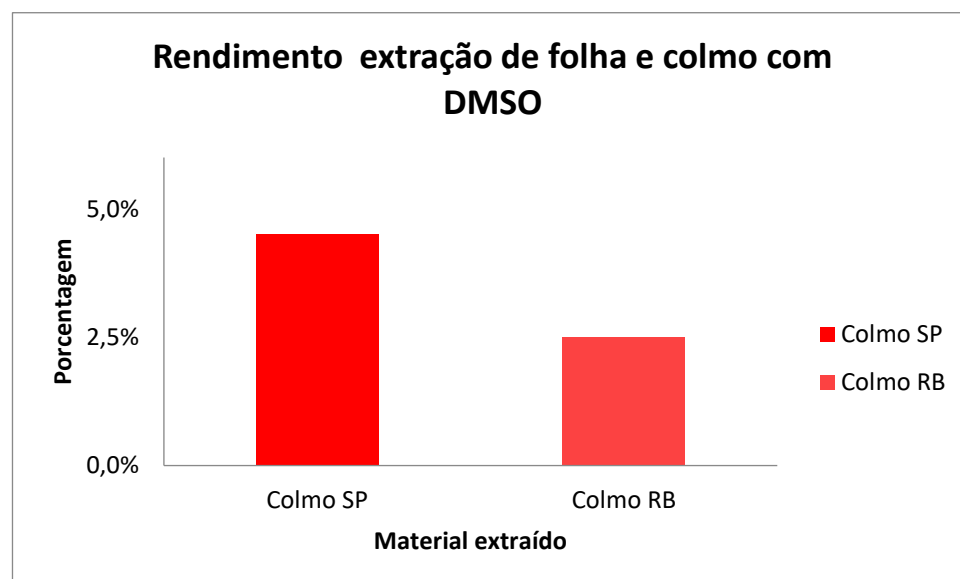


Gráfico 3- Rendimento de todas as extrações individuais e a média.

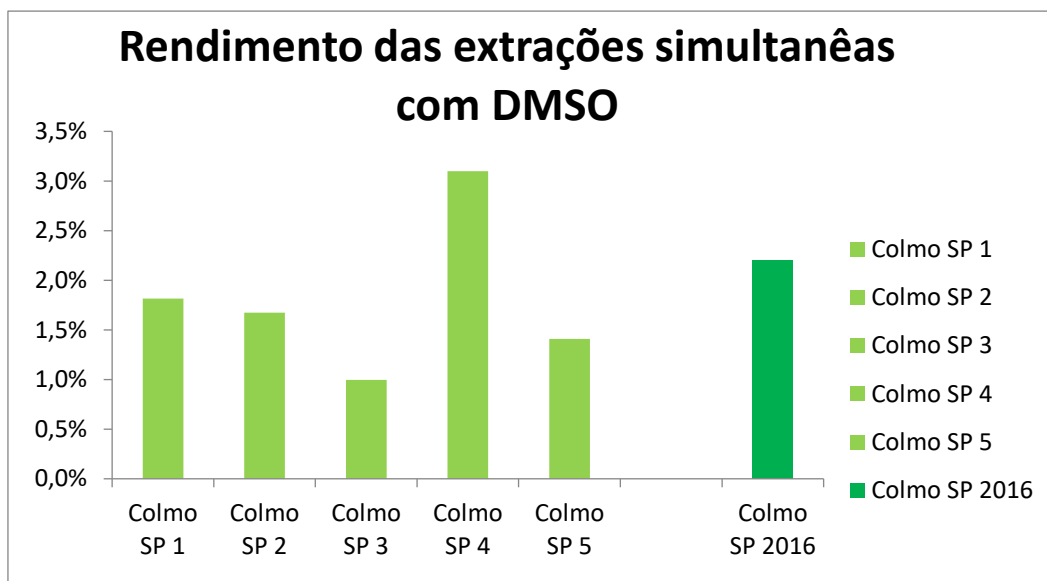
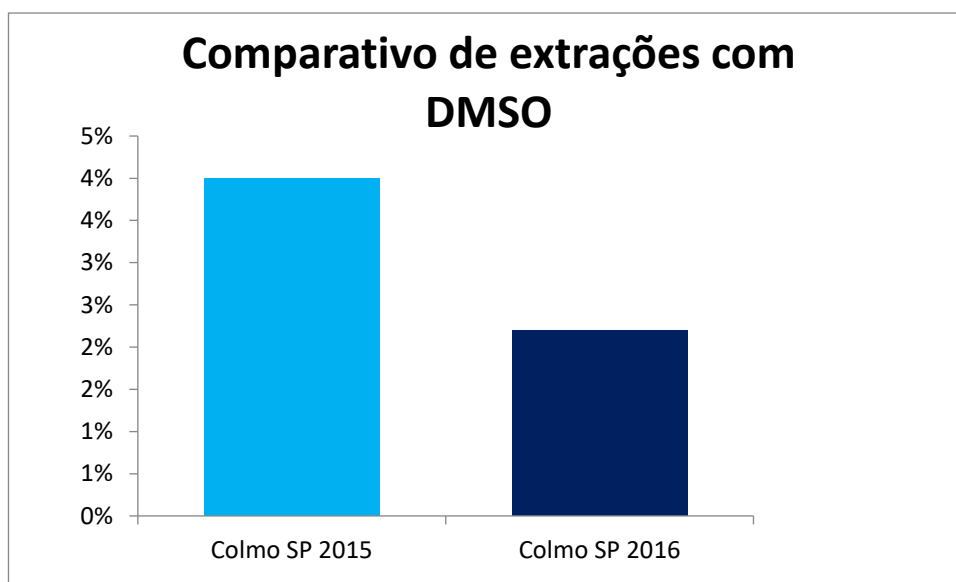


Gráfico 4- Comparação de rendimento de duas extrações a partir da mesma variedade, porém feitas em anos diferentes.



5.2. Análise de polissacarídeo e oligossacarídeo com espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A análise por FT-IR dos polissacarídeos mostrou que a estrutura química do material resultante das extrações com DMSO é praticamente idêntico (Figura 6). O espectro do material extraído com NaOH 4M mostrou-se bastante diferente dos demais, com uma baixa transmitância em regiões associadas a compostos aromáticos como a região de torção C-H (600 a 910) e o estiramento C=O dos aromáticos(1400 a 1610), demonstrando que este material apresenta uma grande quantidade de compostos aromáticos. (RANA *et al.*, 2010).

É provável que essa elevada quantidade de compostos aromáticos esteja associada a lignina, pois na indústria o tratamento com NaOH do bagaço de cana é considerado um tratamento de deslignificação (DE SOUZA *et al.*, 2013).

As demais extrações apresentaram um sinal bem mais baixo de compostos aromáticos, embora seja possível detectar alguns sinais em torno de 1460, sugerindo a presença, por exemplo de ácido ferúlico. Na região entre 1000 e 1200, por outro lado, a transmitância do material extraído com DMSO e NaOH 0,1M é muito maior, é nessa região que se encontram os comprimentos de onda (em inglês- *wavenumbers*) associados a hidroxilas não ligadas e ésteres e carboidratos (1045).

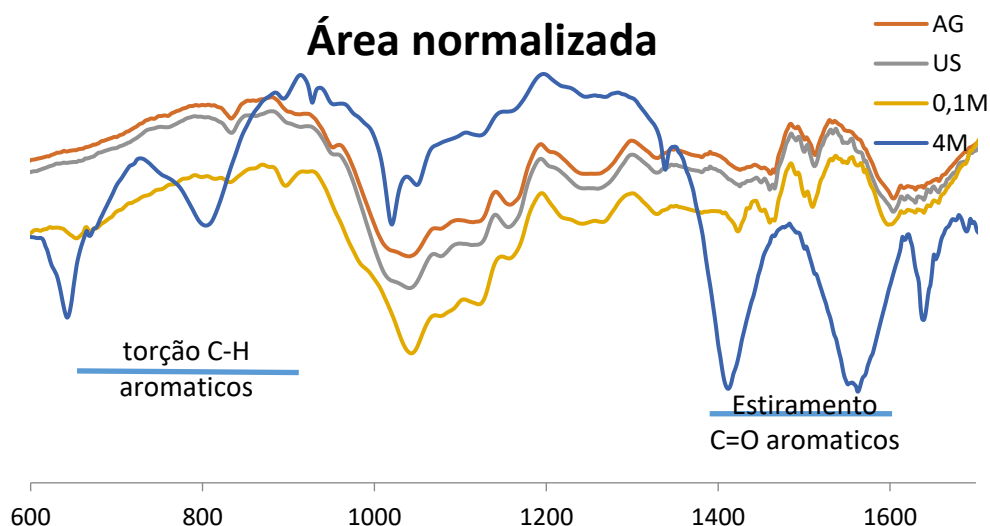
É possível verificar também a diferença entre 0,1 M e DMSO (AG e US) e 4 M no pico relacionado ao arabinoxilano (990), as extrações realizadas com DMSO e 0,1M apresentaram maior presença desse composto do que a de 4 M. Esse resultado sugere a eficácia da extração com DMSO desse composto da parede celular da cana(DE SOUZA *et al.*, 2013).

Nota-se aqui um aumento desses grupos químicos em relação ao extraído com NaOH 4M, pois como a área foi normalizada fazendo com quem os sinais de polissacarídeos tornem-se mais importantes. Por se tratar de uma mistura de polissacarídeos com várias hidroxilas em diversos ambientes químicos, e não de substâncias puras, os picos de transmitância não são bem definidos tornando

muito difícil designa-los, uma vez que grupos químicos como hidroxilas podem apresentar um sinal espalhado por uma grande região, dada a diversidade estrutural dos polissacarídeos.

Os espectros analisados permitem apontar uma grande semelhança estrutural dos polímeros extraídos com DMSO e a presença de grupos químicos como aromáticos e ésteres.

Figura 6- Espectro de FT-IR com sua área normalizada. Regiões típicas de vibrações de fenóis estão indicadas por barras azuis. AG= pó de cana extraído com DMSO em agitação; US= pó de cana extraído com DMSO em ultrassom; 0,1M= extração com NaOH 0,1M e; 4M = extração com NaOH 4 M.



5.3. Purificação de oligossacarídeo com resina Amberlite XAD-2 e análise por HPLC

Figura 7- Gráfico comparativo das frações de colmo de cana SP purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC

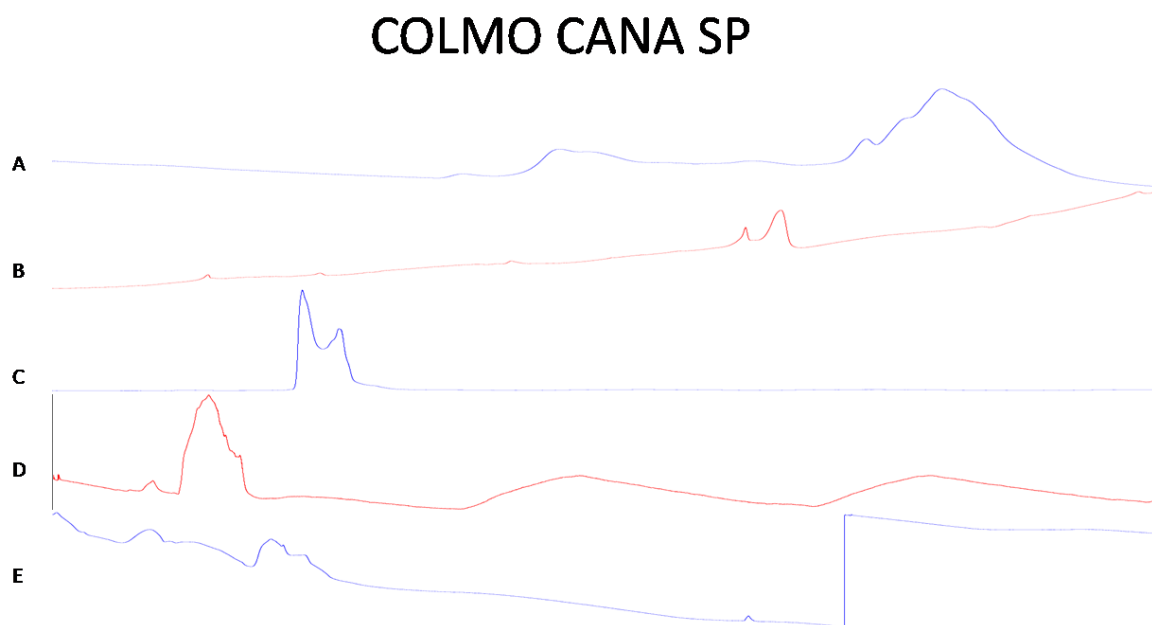


Figura 8- Gráfico comparativo das frações de colmo cana-de-açúcar da variedade RB, purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC.

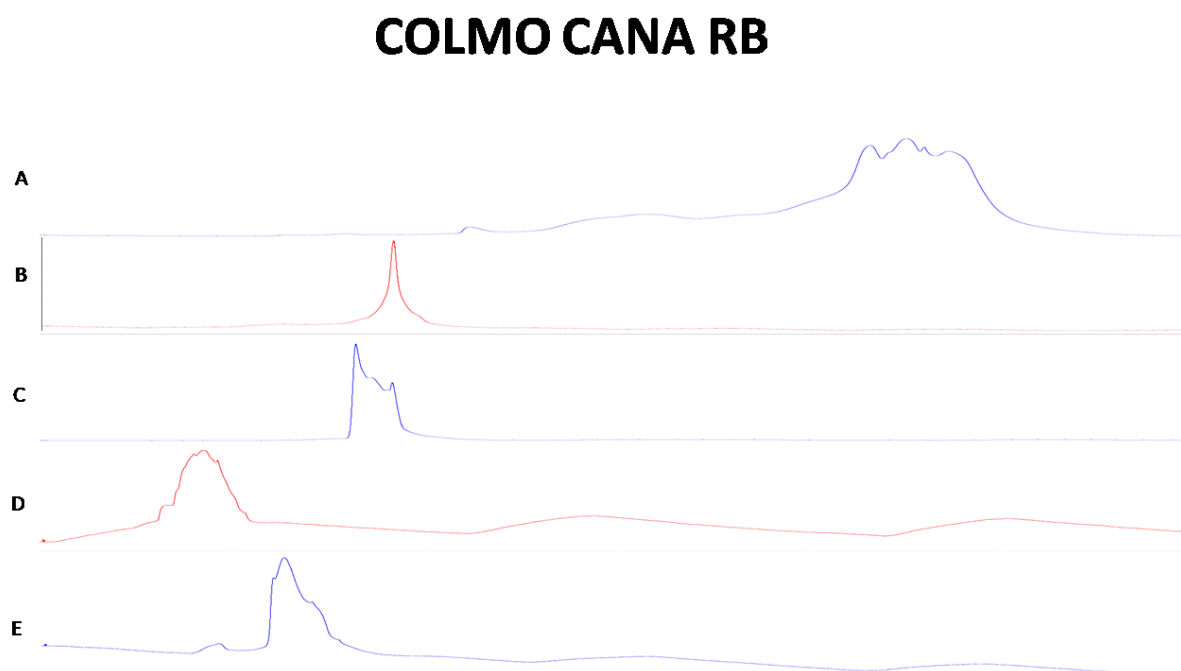


Figura 9- Gráfico comparativo das frações de folha de cana-de-açúcar da variedade RB purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC.

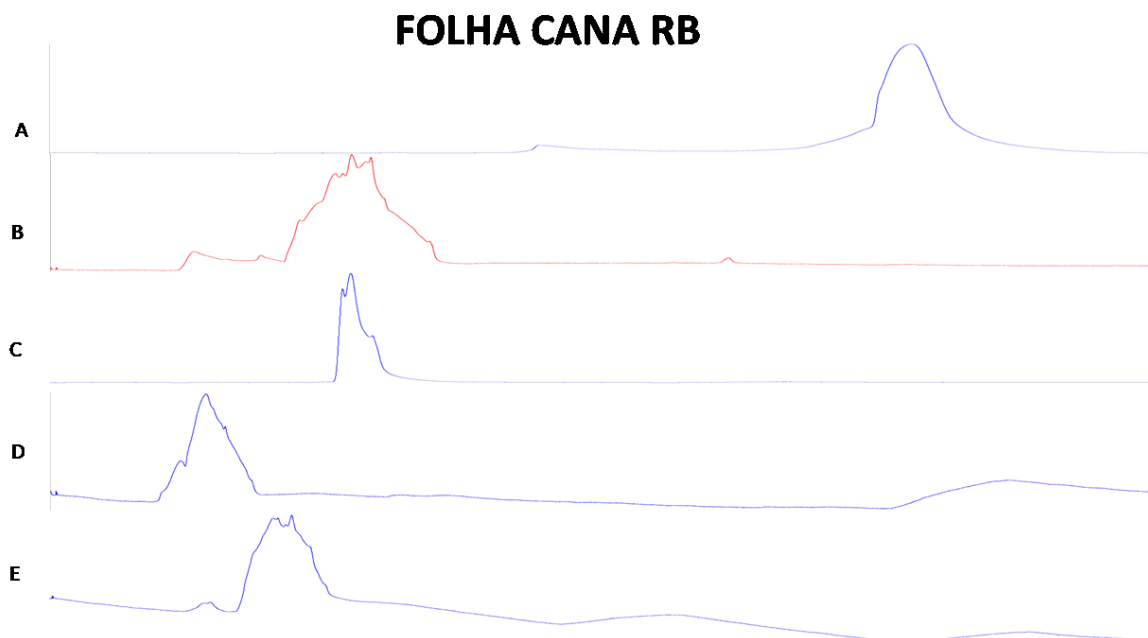
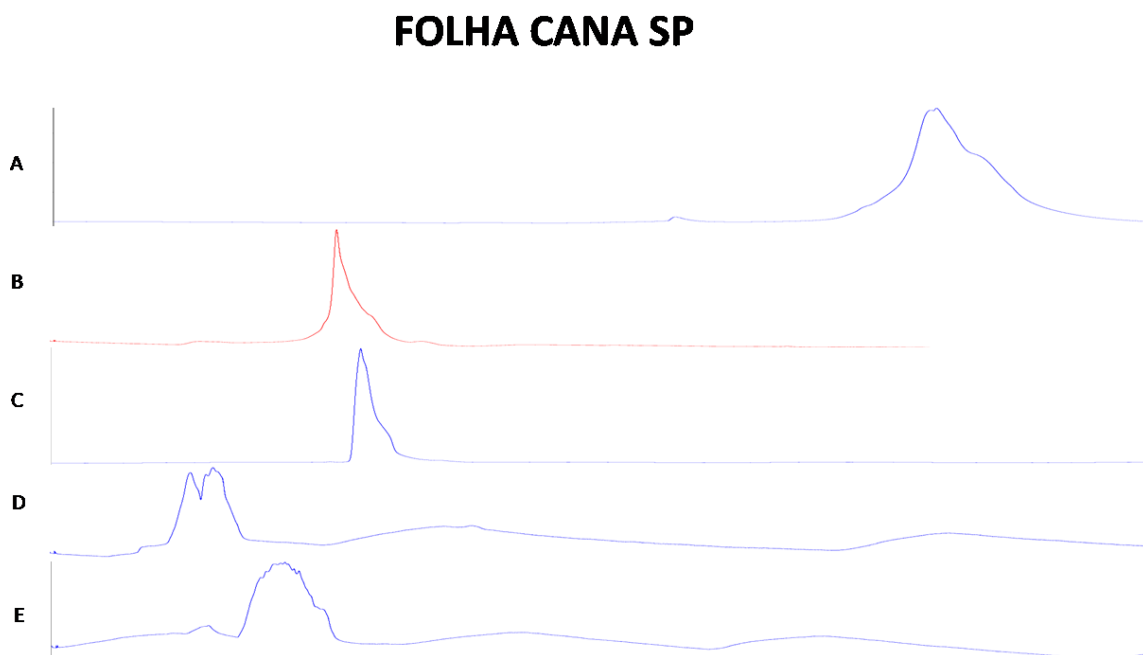


Figura 10- Gráfico comparativo das frações de folha de cana-de-açúcar da variedade SP purificadas com XAD-2 e analisadas em HPLC.



A análise por HPLC das frações confirmou que todas as frações apresentam compostos com absorbância a 254 nm, comprimento de onda em que o ácido ferúlico apresenta grande absorbância e também que o método de separação com XAD-2 é bastante eficiente para a separação dos oligossacarídeos.

É possível notar que o comprimento de onda está focado em detecção de flavonóides, tais como ácido ferúlico e outros compostos fenólicos, apenas os oligossacarídeos com compostos fenólicos estão sendo detectados. Oligossacarídeos formados apenas por carboidratos não são observáveis por essa técnica, o que sugere que a complexidade do padrão de oligossacarídeos é ainda maior do que visto nas figuras 7 a 10. Ainda assim, é possível observar um grande número de oligossacarídeos feruloilados produzido pela digestão com xilanase, o que aponta para uma grande complexidade do arabinoxilano extraído com DMSO.

6. CONCLUSÃO

No geral, a extração de AIR de cana de açúcar com DMSO mostrou-se um método viável de um arabinoxilano com um padrão de ramificação completamente diferente de qualquer outro relatado na literatura. Este arabinoxilano é altamente ramificado e esta estrutura faz com que ele tenha baixa interação com outros polissacarídeos, podendo ser facilmente removido da parede.

É possível que esta fração de arabinoxilano constitua uma fração do polímero com estrutura e função distinta da normalmente associada à celulose, constituindo uma população de arabinoxilano com estrutura e função distinta como observado para o xiloglucano em trabalhos anteriores (Tiné e colaboradores 2003).

O padrão de oligossacarídeos, no entanto se mostrou muito mais complexo do que imaginado, e o fracionamento em resina XAD-2 mostrou-se como uma alternativa interessante para a simplificação do padrão de oligossacarídeos, podendo ajudar nas próximas etapas de identificação dos oligossacarídeos.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR, R. *et al.* Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 309–318, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00106-1)

ALVIRA, P. *et al.* **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>

AMARAL, Adriane Leite do; SANTOS, João Messias dos; BARBOSA, Geraldo Veríssimo de Souza. Denominação de Cultivares de Cana-deAçúcar como Suporte à Documentação e Utilização do Germoplasma Conservado. [S. l.], p. 33, 2015.

ANWAR, Zahid; GULFRAZ, Muhammad; IRSHAD, Muhammad. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>

BARBOSA, Fernando Cesar *et al.* Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 141, n. February, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105697>

BEZERRA, Tais Lacerda; ART J., Ragauskas. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Brasília, v. 299, n. 3, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122635>

BUANAFINA, Marcia M. de O. Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. **Molecular Plant**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 861–872, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mp/ssp067>

CANDIDO, R. G.; MORI, N. R.; GONÇALVES, A. R. **Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis.** [S. l.: s. n.] Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111845>

CARPITA, Nicholas C.; GIBEAUT, David M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>

CESNIK, Roberto. **Melhoramento da cana-de-açúcar marco sucro-alcooleiro no Brasil.pdf**. [S. l.: s. n.].

CHANG, Vincent S.; HOLTZAPPLE, Mark T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 84–86, p. 5–37, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/abab:84-86:1-9:5>

CHEN, Xiaowen *et al.* The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-8>

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento Conab. **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇUCAR- Quarto levantamento da safra 2019/2020**. Brasília: [s. n.], 2020.

CRIVELLARI, Augusto Cesar. **Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de Characterization of the sugarcane cell wall hemicelluloses**. 2012. - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cie.2015.06.022>

DE CARVALHO, Ariovaldo Lopes; ANTUNES, Carlos Henggeler; FREIRE, Fausto. Economic-energy-environment analysis of prospective sugarcane bioethanol production in Brazil. **Applied Energy**, [S. l.], v. 181, p. 514–526, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.122>

DE SOUZA, Amanda P. *et al.* Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 564–579, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1>

FERRARI, Fernanda. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (Saccharum spp., Poaceae)**. 2010. - Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2010.

KHATTAB, Sadat M. R.; WATANABE, Takashi. **Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Status and Perspective**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019 a. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6/00010-2>

KHATTAB, Sadat M. R.; WATANABE, Takashi. **Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019 b. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6/00010-2>

KLEIN, Bruno Colling *et al.* Beyond ethanol, sugar, and electricity: a critical review of product diversification in Brazilian sugarcane mills. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 809–821, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bbb.1969>

KOEHLER, Neil *et al.* **2020 Ethanol industry outlookRenewable fuels association**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2020/02/2020-Outlook-Final-for-Website.pdf>.

NARAN, Radnaa *et al.* Extraction and characterization of native heteroxylans from delignified corn stover and aspen. **Cellulose**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 661–675, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9324-y>

OTERO, José Manuel; PANAGIOTOU, Gianni; OLSSON, Lisbeth. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, [S. l.], v. 108, n. August, p. 1–40, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/10_2007_071

PALM, Magnus; ZACCHI, Guido. Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 617–623, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm020112d>

RANA, Rumana *et al.* FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the

family of Dipterocarpaceae. **Wood Science and Technology**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 225–242, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00226-009-0281-2>

SANCHEZ, Nestor *et al.* Controlling sugarcane press-mud fermentation to increase bioethanol steam reforming for hydrogen production. **Waste Management**, [S. l.], v. 98, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.08.006>

UNIDAS, Organização das Nações. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**GV-executivo. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.12660/gvexec.v14n2.2015.56854>.

VIEIRA, Sabrina *et al.* Sustainability of sugarcane lignocellulosic biomass pretreatment for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 299, p. 122635, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122635>